

## 乙酸激酶（acetate kinase, ACK）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-QT002 微板法 96 样 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

乙酸激酶（ACK, EC 2.7.2.1）是与乙酸代谢相关的关键酶，催化乙酸和 ATP 生成乙酰磷酸和 ADP，最终进入三羧酸循环进行乙酸代谢。

ACK 催化乙酸钠和 ATP 生成乙酰磷酸和 ADP，丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化 NADH 氧化生成 NAD<sup>+</sup>，在 340nm 下测定 NADH 下降速率，即可反映 ACK 活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.2mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂分装后-20℃ 保存。
试剂二	粉剂 4 支	-20℃ 保存	每支： 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.55mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 可分装冻存，禁止反复冻融。
试剂四	液体 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

##### ③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃ 离

心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液 (mL) 为 1:1000~5000 比例进行提取。

## 2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂可放在 37°C 水浴 5-15min。
- ③ 提取液和试剂一和二和三和四可按照 100:40:20:10:10 比例配成混合液 (一枪加 180 $\mu$ L 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 ( $\mu$ L)	测定管
提取液	100
试剂一	40
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	10
混匀, 37°C 下, 孵育 5min 后。	
样本	20
混匀, 37°C 下, 10s 时在 340nm 处读取吸光值 A1, 10min 后读取吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若  $\Delta A$  的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 20min 或更长读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量 V1 (如增至 40 $\mu$ L, 则提取液相应减少), 则改变后的加样体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1, 则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测;
3. 若 A2 值在 0.25 附近或  $\Delta A$  大于 0.6, 可减少反应时间 (如 5min), 则改变后的反应时间 T 代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

### 1、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

### 2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

### 3、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升组织蛋白每小时消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 321.5 \times \Delta A$$

### 4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACK(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ;  $d$ ---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;

T---反应时间, 10 min;

500---细菌或细胞总数, 万。

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

